

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA PROTEASA**  
**PRODUCIDA POR *Bacillus licheniformis* LB04**

**Por:**

**Q.F.B. LAURA IVETTE MONTES VÁZQUEZ**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS**  
**con Orientación en MICROBIOLOGÍA APLICADA**

---

**Dr. Edgar Allan Blanco Gámez**  
**Director de Tesis**

**MONTERREY, N.L.**

**AGOSTO, 2020**

**“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA PROTEASA PRODUCIDA POR *Bacillus licheniformis* LB04”**

**Comité de Tesis:**

---

Dr. Edgar Allan Blanco Gámez

**Director**

---

Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio

**Comité Tutorial**

---

Dra. Melissa Marlene Rodríguez Delgado,

**Comité tutorial**

---

Dr. Juan Francisco Villareal Chiu

**Comité Tutorial**

---

Dra. María Elena Cantú Cárdenas

**Sub-Directora de Estudios de Posgrado**

2018-2020

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente de la manera más atenta a mi asesor de tesis: el Dr. Edgar Allan Blanco Gámez, por darme la otorgarme este proyecto y el apoyo durante la duración de mi posgrado. También agradezco a los integrantes de mi comité tutorial, la Dra. Melissa Marlene Rodríguez Delgado, Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio y el Dr. Juan Francisco Villareal Chiu por sus aportaciones e interés en mi proyecto.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante estos dos años de posgrado.

A la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) por bríndame la oportunidad de realizar mi posgrado en sus instalaciones y formarme académicamente en mi formación de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada.

Al Centro de Laboratorios Especializados de la Facultad de Ciencias Químicas (CELAES) más específicamente el Laboratorio de Biotecnología y el Laboratorio de Biología Molecular y a todas las personas que trabajan en estos laboratorios, por la utilización de sus instalaciones y por todo el apoyo para la realización de este proyecto. De igual manera agradezco al Centro de Investigación de Biotecnología y Nanotecnología (CIBYN) por permitirme realizar parte de mi experimentación en mi proyecto.

Agradezco a la Dra. María Elena Cantú Cárdenas y al Dr. Xristo Zarate Kalfópulos por todo el apoyo que me brindaron durante mis estudios.

Gracias al Dr. Ángel Gabriel Díaz Sánchez por permitirme realizar mi estancia de investigación en el Laboratorio de Bioquímica y Neuroquímica, ubicado en el Instituto de Ciencias Biomédicas (ICB) de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ), así como a todas las personas que me ayudaron durante mi estancia.

Agradezco al Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño por permitirme usar las instalaciones en el Laboratorio de Biología Molecular para realizar parte de mi experimentación.

A la M.C. Anaid Mayela Silva Salinas por siempre ayudarme y sacarme de dudas mientras trabajamos juntas en el laboratorio.

Mil gracias a mi compañera de generación y mi amiga Renee Gamboa Quezada por siempre apoyarme, ayudarme y darme ánimos durante este proceso.

Agradezco a mi entrenador Diego Alejandro Arvizu Lozoya por siempre apoyarme y comprenderme, ya que en la realización de este proyecto solía tomar tiempo de los entrenamientos e inclusive faltar a los mismos. Gracias también por adaptar mis entrenamientos a mis horarios irregulares.

Gracias a mi prometido Roberto Ernesto Quiñones Valenzuela por el apoyo brindado y la comprensión para realizar este posgrado fuera de mi ciudad natal.

Agradezco a mi familia, mis padres María de la Luz Vázquez Villa y Rogaciano Montes Escamilla y mi hermana Lizeth Ivonne Montes Vázquez por su amor incondicional, su apoyo y comprensión para realizar este posgrado, ya que sin ellos nada de esto hubiera sido posible.

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo de investigación a mi familia.

A mis padres María de la Luz Vázquez Villa y Rogaciano Montes Escamilla por su apoyo incondicional, ya que ellos fueron el principal cimiento para el desarrollo de este posgrado. A mi hermana Lizeth Ivonne Montes Vázquez que aun estando lejos siempre me demostró todo su apoyo y a Elvis por darme su amor incondicional.

A mi prometido por siempre darme ánimos y alentarme a ser mejor cada día, también por tolerar mi estancia en Monterrey y por siempre creer en mí.

## RESUMEN

A nivel mundial las proteasas representan el 60% de ventas totales de enzimas, debido a esto ha aumentado la demanda global de estas. Las proteasas tienen un gran campo de aplicación en diferentes industrias como en la industria de los alimentos, cosmética, farmacéutica, de los detergentes, del cuero, entre otras; así como también se utilizan en procesos de biorremediación. Las proteasas son aquellas enzimas capaces de hidrolizar el enlace peptídico en las proteínas, separándolas en aminoácidos o péptidos más pequeños. En los últimos años se ha dado un enfoque al estudio de las enzimas producidas por bacterias extremófilas con el fin de caracterizarlas y purificarlas para su uso industrial; estas bacterias tienen la característica de subsistir en ambientes con condiciones extremas como temperaturas extremas, presiones elevadas, pH extremos, radiación, etc. *Bacillus licheniformis* es utilizado ampliamente para la producción de enzimas industriales como: proteasas, amilasas, penicilinasas, enzimas pectinolíticas, etc.

En esta investigación se tiene como objetivo principal caracterizar la proteasa producida por el *Bacillus licheniformis* LB04 termotolerante aislado del municipio de mina en Nuevo León, México; en términos de actividad y estabilidad a diferentes factores. Se cuantificó la actividad proteolítica, obteniendo una actividad enzimática total: 117.1 U/mL y una actividad específica: 98.6 U/mg, presento una temperatura de máxima actividad enzimática 40°C y un pH de máxima actividad enzimática 8.0. En las pruebas de estabilidad enzimática a diferentes temperaturas y pH, se mantuvo una actividad enzimática del 50% en un rango de temperatura de 40-70°C en pH 8. La actividad enzimática se conservó una actividad enzimática entre 70-50% en un rango de pH de 8-10 a 40°C. El extracto crudo enzimático mantiene su actividad en 91%, 61% y 13% en las siguientes concentraciones de SDS 0.5%, 1% y 5%; en el caso del Tritón X-100 se presentó una actividad del 98% y el 84% en las concentraciones del 1% y 5%.

Mediante los resultados obtenidos al cuantificar la actividad enzimática a diferentes pH se puede observar que la proteasa o las proteasas son del tipo alcalino. El extracto crudo enzimático presenta alta estabilidad a surfactantes.

**Pendiente:** Realizar los geles SDS-Page y el zimograma con gelatina para identificar el peso molecular de la proteasa e identificar el tipo de la proteasa utilizando inhibidores para serin-proteasas y metaloproteasas.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....</b>	<b>1</b>
1.1.Importancia de las Proteasas en la Industria.....	6
1.2.Proteasas .....	6
1.2.1.    Clasificación de las Proteasas.....	7
1.3.Microorganismos Extremófilos .....	8
1.4.Género <i>Bacillus</i> como Fuente de Enzimas con Aplicaciones Industriales.	9
1.5. <i>Bacillus licheniformis</i> .....	10
1.5.1.    Características de las Proteasas Producidas por <i>Bacillus licheniformis</i> .....	10
<b>CAPITULO 2: JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>13</b>
2.1.Justificación.....	12
<b>CAPITULO 3: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
3.1.Hipótesis.....	14
3.2.Objetivos .....	15
3.2.1.    Objetivo general.....	15
3.2.2.    Objetivos específicos.....	15
<b>CAPITULO 4: REACTIVOS Y MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
4.1.Material biológico, Reactivos y Equipo .....	16
4.1.1.    Material Biológico .....	16
4.1.2.    Reactivos .....	16
4.1.3.    Equipo .....	17
4.2.Métodos.....	18
4.2.1.    Cultivo de Microorganismo.....	18
4.2.2.    Pruebas Cualitativas de la Actividad Proteolítica.....	19
4.2.3.    Cuantificación de la actividad proteolítica.....	19
4.2.4.    Curva de Crecimiento Microbiano y Curva de Actividad Enzimática.....	20
4.2.5.    Determinación del perfil de comportamiento de la proteasa a diferentes temperaturas y pH .....	21
4.2.6.    Determinación de la estabilidad de la proteasa a diferentes temperaturas y pH22	
4.2.7.    Determinación resistencia a detergentes .....	23

<b>CAPITULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>25</b>
5.1.Crecimiento del microorganismo .....	24
5.2. Determinación cualitativa de la actividad proteolítica del sobrenadante	25
5.3. Curva estándar de tirosina.....	26
5.4. Determinación cuantitativa de la actividad enzimática.....	27
5.5. Curva de crecimiento microbiano y curva de actividad enzimática.....	29
5.6.Cuantificación de la actividad enzimática y estabilidad a diferentes temperaturas .....	30
5.7.Cuantificación de la actividad enzimática y estabilidad a diferentes pH..	32
5.8.Determinación resistencia a surfactantes.....	35
<b>CAPITULO 6: CONCLUSIONES .....</b>	<b>37</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>38</b>

## ÍNDICE DE TABLAS



<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
I. Ejemplos de Cada Tipo de Proteasa y su Fuente de Obtención(Sawant & Nagendran, 2014). ....	8
II. Composición del Caldo Caseína (Jellouli <i>et al.</i> , 2011) .....	18
III. Composición solución de Azul de Coomassie y Solución para Desteñir	19
IV. Fórmulas Actividad Enzimática .....	20
V. Buffers utilizados para ajustar los diferentes pH. ....	21
VI. Detergentes y concentraciones utilizadas en cada ensayo para determinar la estabilidad. ....	23
VII. Resultados Cuantificación de la Actividad Enzimática en el Sobrenadante.....	27
VIII. Actividad Enzimática Residual con el Efecto de Detergentes. ....	36

## ÍNDICE DE IMAGENES

<b>Imagen</b>	<b>Página</b>
---------------	---------------

1. Morfología macroscópica de <i>Bacillus licheniformis</i> LB04 en agar nutritivo. .....	25
2. Morfología microscópica de <i>Bacillus licheniformis</i> LB04 .....	25
3. a) Placa de gelatina después de 12 horas de incubación. las flechas indican la hidrólisis de la gelatina. b) Placa de gelatina teñida con Azul de Coomassie. ....	26
4. Curva Estándar de Tirosina y Ecuación de la Recta .....	27
5. Crecimiento de la bacteria <i>Bacillus licheniformis</i> LB04 expresado mediante la densidad óptica y la actividad enzimática total con respecto al tiempo.....	25
6. Perfil de Actividad Enzimática a Diferentes Temperaturas.....	31
7. Actividad Enzimática Total vs Estabilidad Enzimática a Diferentes Temperaturas .....	32
8. Perfil de Actividad Enzimática a diferentes pH .....	33
9. Actividad Enzimática Total vs Estabilidad Enzimática en Diferentes pH .	34

## **CAPITULO 1**

### **INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES**

#### **1.1. Importancia de las Proteasas en la Industria**

Las proteasas tienen un gran potencial biotecnológico, y por esta razón tienen una gran demanda, ya que representan el 65% del total de las enzimas que están en el mercado mundial (Hadjidj *et al.*, 2018). Estas enzimas tienen diversas aplicaciones en la industria farmacéutica/cosmética, elaboración de detergentes, industria alimentaria, industria de la piel, procesos de biorremediación, etc. (Tavano, *et al.*, 2018). En la industria de los alimentos sirven para ablandar carne, debido a que estas degradan el colágeno y elastina de la carne; también se utilizan para la elaboración del pan degradando el gluten aumentando la capacidad de la masa para retener burbujas de aire (Contesini, *et al.*, 2017). En la industria del cuero las proteasas ayudan a suavizar la piel; en la industria de los detergentes las proteasas son capaces de degradar las proteínas que están adheridas a las fibras textiles, entre otros usos y aplicaciones (López-Otin & Bond, 2014).

En los últimos años las investigaciones se han enfocado en el estudio de las proteasas microbianas esto debido a que tienen más ventajas en comparación con las proteasas animales o vegetales (Sawant & Nagendran, 2014). Entre las ventajas principales se encuentran un menor costo de producción, mayor posibilidad de producir a gran escala, son más factibles para manipularlas genéticamente, menor tiempo de producción ya que los microorganismos crecen en un tiempo relativamente corto en comparaciones de una planta o un animal (Lo & Bond, 2009). Las características antes mencionadas permiten que las proteasas microbianas sean los biocatalizadores ideales para diversas aplicaciones industriales.

#### **1.2. Proteasas**

Las hidrolasas son enzimas que rompen enlaces covalentes mediante reacciones hidrolíticas, este grupo incluye enzimas que pueden degradar proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos (Armstrong & Bennet, 1986); estando entre ellas las lipasas, fosfatasas, clorofilasas, amilasas y proteasas.

Las proteasas son aquellas enzimas capaces de hidrolizar el enlace peptídico entre los aminoácidos en una proteína o péptido (Jellouli *et al.*, 2011). Las proteasas generalmente activan un nucleófilo que a su vez atacará el carbono del enlace peptídico; los electrones pertenecientes al doble enlace carbono-oxígeno migran hacia el oxígeno a medida que el nucleófilo se adhiere, este intermediario es de alta energía y la proteasa generalmente tiene una forma de estabilizarlo. El intermediario se descompone, liberando los dos fragmentos peptídicos (Tavano, *et al.*, 2018). Las proteasas son esenciales para varios procesos fisiológicos, por ejemplo, en la digestión de proteínas alimentarias, rotación de proteínas, división celular, cascada de coagulación de la sangre, transducción de señales, procesamiento de hormonas polipéptidos, apoptosis y también en el ciclo de vida de los organismos causantes de enfermedades, incluida la replicación del retrovirus (Sawant & Nagendran, 2014).

### **1.2.1. Clasificación de las Proteasas**

Se clasifican generalmente en endopeptidasas y exopeptidasas. Las endopeptidasas se encargan del desdoblamiento de los enlaces péptidos localizados en el centro de la cadena peptídica. En cambio, las exopeptidasas remueven el aminoácido final (Murray, *et al.*, 2014). Estas se dividen en 2 tipos: carboxipeptidasa o aminopeptidasas, las cuales hidrolizan la proteína en el carbono terminal o el amino-terminal respectivamente. Las proteasas también se agrupan por la conformación estructural de sus sitios activos:

- Serin Proteasa: Tiene una serina en su sitio activo que se une covalentemente a uno de los fragmentos de la proteína como un intermediario enzimático.

- Cistein-proteasa: Tiene una cisteína en su sitio activo unida covalentemente a unos de los fragmentos de la proteína.
- Proteasas Aspárticas: Tienen dos residuos esenciales de ácido aspártico que están unidos muy unidos en el sitio activo.
- Metaloproteasas: Tienen un ion metálico en su sitio activo

En la tabla I se muestra un ejemplo de cada grupo de proteasas, incluyendo la fuente donde se obtiene la enzima.

Tabla I: Ejemplos de Cada Tipo de Proteasa y su Fuente de Obtención(Sawant & Nagendran, 2014).

Endopeptidasa		Exopeptidasa	
Enzima	Fuente	Enzima	Fuente
Serin-Proteasas			
Proteinasa K	Microbiana	Carboxipeptidasa Y	Microbiana
Cistein-proteasas			
Papaína	Vegetal	Catepsina C	Animal
Metaloproteasas			
Termolisina	Microbiana	Carboxipeptidasa A	Animal
Proteasa Aspártica			
Pepsina	Animal		

### 1.3. Microorganismos Extremófilos

Los microorganismos se encuentran en todos los hábitats del planeta. Han ido evolucionando para adaptarse a los lugares que presentan las condiciones más extremas (Hadjidj et al., 2018). Estas condiciones obligan a los microorganismos a producir las enzimas necesarias para poder subsistir. El termino extremófilos

fue utilizado por primera vez por Macelroy en 1974. Los microorganismos extremófilos crecen en condiciones extremas las que incluyen: temperaturas elevadas (50-121°C) o bajas (-2-20°C), alta salinidad (NaCl 2-5 M) y alta alcalinidad (pH arriba de 8) o alta acidez (pH menor a 4)(Ramírez, *et al.*, 2006). El descubrimiento de microorganismos que habitan en ambientes con condiciones extremas despertó el interés en dar enfoque a su estudio desde el punto de vista biotecnológico debido a las características de estos microorganismos ya que sus biomoléculas son resistentes a las condiciones de su entorno.

En la primera década de los 2000 la mayoría de las enzimas utilizadas se obtenían de microorganismos mesófilos (Ramírez, *et al.*, 2006), eran de gran utilidad pero su actividad se veía restringida debido a una estabilidad limitada en los extremos de temperatura, de pH y de la fuerza iónica; en comparación con los extremófilos son una fuente amplia de enzimas que cuentan con una alta estabilidad en condiciones extremas(Salem et al., 2016).

#### **1.4. Género *Bacillus* como Fuente de Enzimas con Aplicaciones Industriales**

Uno de los principales géneros bacterianos capaces de resistir condiciones hostiles de crecimiento es *Bacillus*. Estos microorganismos son bacilos Gram positivos, delgados y largos, sus bordes son redondeados, son aerobios o anaerobios facultativos (Whitman, 2009), quimiorganotrofos y son motiles ya que tienen flagelos peritricos. Son capaces de formar esporas (terminales, centrales y subterminales en condiciones aerobias), gracias a esto tienen la capacidad sobrevivir a condiciones adversas por un largo tiempo (Koneman *et al.*, 2008). La mayoría de las especies de este género son saprofitas por esto se localizan en suelos, plantas y agua (Negroni, 2009). La capacidad de habitar en distintos ambientes (que presentan distintos pH y temperaturas) se debe a lo versátil que es su metabolismo, por esta razón este género cuenta con microorganismos psicrófilos, mesófilos y termófilos, así como acidófilos y alcalófilos (Castillo-Rodriguez, 2005; Koneman *et al.*, 2008). Debido a su excepcional metabolismo, hay algunas especies capaces de hidrolizar almidón, ADN y una gran variedad de fuentes de carbono como celulosa, quitina, metanol, entre otras (Mota-

Pacheco, 2013). Se han descrito alrededor de 70 especies de este género (Negroni, 2009), las cuales tienen un alto potencial biotecnológico.

### **1.5. *Bacillus licheniformis***

*Bacillus licheniformis* se encuentra ampliamente distribuido en aguas termales, suelos contaminados, compostas, plumas de aves, cuero, superficies rocosas, en leche y otros alimentos; esta especie ha sido aislada de los tejidos de plantas sanas de algodón, uva, chícharo y maíz (Hadjidj et al., 2018; Parihar & Dubey, 2017; Whitman, 2009).

*Bacillus licheniformis* es un bacilo Gram positivo, motil, con un tamaño de 0.6-0.8 por 1.5-3.0  $\mu\text{m}$ . Se pueden presentar en bacilos individuales, pares o cadenas. Son capaces de formar esporas cilíndricas (Whitman, 2009). Presenta colonias irregulares con un diámetro de 2-4 mm, con un color que puede variar de gris cremoso a blanquecino; con una consistencia húmeda o mucosa. Las colonias son bastantes adherentes y debido a la migración que tienen la colonias están dan como resultado un crecimiento extendido en la placa (Mota-Pacheco, 2013; Whitman, 2009) Son capaces de crecer a una temperatura mínima de 15°C y la máxima entre 50-55° (Mota-Pacheco, 2013). Crecen a un pH de 5.7 a 6.8, con un contenido de NaCl del 7%, son catalasa-positiva, oxidasa variable. Hidrolizan caseína, almidón, celulosa, gelatina, etc.; algunas cepas hidrolizan urea. Descomponen pectina y polisacáridos presentes en los tejidos de plantas (Ikram-UI-Haq, et al, 2005). *Bacillus licheniformis* es ampliamente utilizada para la producción de enzimas industriales incluyendo proteasas,  $\alpha$ -amilasas, penicilinasa ( $\beta$ -lactamasa), pentonasas, cicloglucosil-transferasas,  $\beta$ -manasas y varias enzimas pectinolíticas (Rey et al., 2004).

#### **1.5.1. Características de las Proteasas Producidas por *Bacillus licheniformis***

Las proteasas de *Bacillus licheniformis* se utilizan con frecuencias en la elaboración de detergentes, síntesis de péptidos, en la industria del cuero, en la industria textil y de la seda, elaboración de productos lácteos, panadería, biorremediación, etc. (Hadjidj et al., 2018). Debido a las características

metabólicas de *Bacillus licheniformis* le proporciona un alto potencial biotecnológico. En la última década se han realizado varias investigaciones enfocadas a la caracterización y purificación de las proteasas producidas por distintas cepas *Bacillus licheniformis*.

Las proteasas de *Bacillus licheniformis* en general tienen un peso molecular entre los 30-50 kDa (Hadjidj *et al.*, 2018; Jellouli *et al.*, 2011; Ji *et al.*, 2020; Sharma, *et al.*, 2017; Yilmaz, *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019); pero hay proteasas que tienen pesos moleculares más grandes o menores a este rango por ejemplo la proteasa producida por *Bacillus licheniformis* SWJS33 tiene un peso de 100 kDa (Lei, *et al.*, 2017).

Las proteasas de *Bacillus licheniformis* presente su actividad máxima en un rango de temperatura entre los 40-80°C: *Bacillus licheniformis* A10 – 40°C, *Bacillus licheniformis* BL312 – 55°C, *Bacillus licheniformis* SWJS33 – 60°C; *Bacillus licheniformis* A10, *Bacillus licheniformis* MP1, *Bacillus licheniformis* K7A – 70°C, *Bacillus licheniformis* RBS5 – 80°C (Hadjidj *et al.*, 2018; Jellouli *et al.*, 2011; Lei *et al.*, 2017; Yilmaz *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019).

Las proteasas producidas por esta bacteria tienen una actividad máxima en pH alcalinos: *Bacillus licheniformis* A10 – pH 9; *Bacillus licheniformis* MP1, *Bacillus licheniformis* N2, *Bacillus licheniformis* APP-007 – pH 10; *Bacillus licheniformis* RBS 5 – pH 12. (Jellouli *et al.*, 2011; Lei *et al.*, 2017; Shaikh & Dixit, 2017; Sharma *et al.*, 2017; Yilmaz *et al.*, 2016).

La mayoría de las proteasas tienen alta resistencias a las surfactantes, detergentes y iones metálicos; también presentan una estabilidad alta en pH alcalinos y temperaturas arriba de 40°C ya que posterior el tratamiento estas mantienen una actividad residual entre el 60-100%. Esta última característica es de importancia para la aplicación industrial de estas proteasas ( Ji *et al.*, 2020; Shaikh & Dixit, 2017; Yu, *et al.*, 2019).



## **CAPITULO 2**

### **2.1. JUSTIFICACIÓN**

En este proyecto se busca la caracterización de la proteasa producida por el *Bacillus licheniformis* LB04 termotolerante aislado del municipio de Mina en

Nuevo León, México; en términos de actividad y estabilidad a diferentes factores, ya que el género *Bacillus* es una excelente fuente de enzimas proteolíticas con aplicaciones industriales.

En los últimos años las investigaciones relacionadas a *Bacillus licheniformis* giran en torno a sus enzimas, ya que al ser una bacteria termotolerante y alcalófila presentan enzimas capaces de tolerar esas condiciones. Las enzimas de esta bacteria tienen características particulares que proporcionan un alto potencial biotecnológico. Especialmente las proteasas tienen un gran uso en la industria de los detergentes, industria alimentaria, industria textil, entre otras. Es importante caracterizar bioquímicamente las proteasas producidas por este tipo de microorganismos ya que presentan características que las proteasas de bacterias mesófilas no tienen además que contienen una alta actividad enzimática, y de esta manera lograr producirlas a gran escala para después destinarlas para su uso industrial y comercial, dependiendo de las características bioquímicas que estas presenten.

La mayoría de las proteasas comerciales son obtenidas de bacterias extremófilas, ya que estas enzimas presentan características como termoestabilidad, resistencia a desnaturizantes, pH extremos y disolventes orgánicos (Castillo-Rodriguez, 2015). La mayoría de las proteasas comerciales trabajan en rango de temperatura entre 40-80°C, en pH de 10-12 y presentan resistencia a detergentes o surfactantes (Parihar & Dubey, 2017).

Basado en todo lo anterior se busca obtener las condiciones a las que la enzima produzca su mayor actividad enzimática, buena estabilidad y resistencia a detergentes surfactantes, utilizando caseína como sustrato. Se espera que la enzima presente una temperatura óptima de 60°C y pH óptimo en un rango de pH de 9-12 y que mantenga su estabilidad en presencia detergentes surfactantes al menos en un 70%. Dependiendo de las características que se obtengan en un futuro se podrá purificar y buscar su aplicación industrial ideal.

## **CAPITULO 3**

### **HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1. Hipótesis**

La proteasa producida por *Bacillus licheniformis* LB04 presentara la máxima actividad enzimática en pH alcalino, temperatura mayor a 60°C y estabilidad a detergentes.

### **3.2. Objetivos**

#### **3.2.1. Objetivo general**

Caracterizar bioquímicamente la proteasa producida por *Bacillus licheniformis* LB04

#### **3.2.2. Objetivos específicos**

- 1) Comprobar la actividad enzimática del *Bacillus licheniformis* LB04 por métodos cuantitativos y cualitativos.
- 2) Determinar el perfil de comportamiento de la proteasa a diferentes temperaturas y pH.
- 3) Determinar la estabilidad de la proteasa a diferentes temperaturas y pH.
- 4) Determinar la estabilidad de la proteasa en detergentes

## **CAPITULO 4**

### **MATERIALES Y METODOS**

#### **4.1. Material biológico, Reactivos y Equipo**

##### **4.1.1. Material Biológico**

Se utilizó la cepa de *Bacillus licheniformis* LB04 perteneciente al cepario del laboratorio de biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

##### **4.1.2. Reactivos**

- Medio LB Difco™
- Caseína Sigma-Aldrich
- Cloruro de sodio J.T. Baker®
- Fosfato monopotásico J.T.Baker
- Fosfato dipotásico J.T.Baker
- Extracto de levadura BD Bioxon
- Peptona de caseína BD Bioxon
- Gelatina
- Cloruro de calcio J.T.Baker
- Nitrato de amonio
- Sulfato de magnesio J.T.Baker
- TRIS Cytiva®
- Ácido clorhídrico J.T. Baker®
- Glicina Sigma®
- Hidróxido de Sodio J.T.Baker

- Tirosina Sigma®
- Carbonato de Sodio J.T.Baker
- Azul de Coomassie Thermo Scientific™
- Dodecilsulfato sódico (SDS) Biorad®
- Tritón X-100 Biorad®
- Hidróxido de sodio J.T.Baker
- Agar nutritivo BD Bioxon
- Caldo Nutritivo BD Bioxon
- EDTA Biopack®
- Ácido Tricloroacético J.T. Baker®

#### **4.1.3. Equipo**

- Centrifuga
- Incubadora con agitación
- Espectrofotómetro UV-Vis
- Cámara vertical para electroforesis
- Vortex
- Autoclave
- Fuente de electroforesis
- Campana de flujo laminar
- Mecheros
- Microcentrífuga
- Potenciómetro
- Lector de microplaca "FLUOstar omega".
- Microscopio

## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Cultivo de Microorganismo

Se realizó un preinoculo utilizando medio Lysogeny Broth (LB) tomando una asada del glicérado que contiene la bacteria (*Bacillus licheniformis* LB04) en cultivo puro. Se incubó por 12 horas a 45°C en agitación a 150 rpm.

Se preparó un caldo caseína de 250 mL (tabla III) ajustando el pH del medio a 8.5 (Jellouli et al., 2011). Se utilizó este medio rico en proteína (caseína) para optimizar la producción de proteasas. Se realizó una dilución 1/20 tomando 12.5 mL del preinoculo y se añadió al caldo caseína previamente esterilizado. Se incubó a 45°C por 48 horas en agitación a 150 rpm, ya que la bacteria que presenta un mayor crecimiento entre temperaturas de 40-50°C (Blanco,2016). También se realizaron cajas de agar nutritivo y se sembraron por estría utilizando como muestra el preinoculo que se utilizó anteriormente, se incubo a 45°C por 24 horas, esto para observar la morfología macroscópica de la bacteria. Se realizó tinción de Gram a los dos cultivos, para observar su morfología microscópica.

Tabla II: Composición del Caldo Caseína (Jellouli et al., 2011)

Composición	%(p/v)
Caseína	1
Extracto de levadura	.2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	.1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	.1

#### 4.2.2. Pruebas Cualitativas de la Actividad Proteolítica

Para realizar las pruebas cualitativas y cuantitativas se utilizó el sobrenadante del cultivo con caldo caseína. El cultivo se centrifugó a 9000 rpm durante 40 minutos, se almacenó el sobrenadante a 4°C.

La actividad proteolítica se determinó cualitativamente utilizando placas de gelatina al 12%. Se realizaron 4 perforaciones en la placa, se agregó 100 µL de sobrenadante a cada perforación se incubó a 40°C por 2 horas. Pasado el tiempo de incubación se procedió a teñir con Azul de Coomassie (tabla IV) durante 12 horas, después se retiró el colorante y se agregó solución para desteñir (tabla IV) por 2 horas, pasado el tiempo se enjuaga con agua corriente.

Tabla III: Composición solución de Azul de Coomassie y Solución para Desteñir

Azul de Coomassie		Solución para Desteñir	
Azul de Coomassie	2.5 g	Metanol	200 mL
Metanol	450 mL	Ácido Acético Glacial	150 mL
Ácido acético glacial	100 mL	Aforar a 1 L con agua destilada	
Aforar a 1 L con agua destilada			

#### 4.2.3. Cuantificación de la actividad proteolítica

La actividad proteolítica se cuantificó utilizando caseína como sustrato. Se realizó una mezcla de reacción que contiene 250 µL de solución de caseína (Buffer TRIS-HCl 100 mM con caseína al 1% p/v, pH 8) y con 50 µL de sobrenadante del medio de cultivo previamente centrifugado, se incubó a 45°C por 20 minutos, la reacción se detuvo con ácido tricloroacético al 5%, y el contenido se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se examinó en el lector de microplaca FLUOstar omega a 280 nm para detectar la presencia de tirosina



comparando con una curva estándar de tirosina. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 µg de tirosina perteneciente a la caseína por minuto (Singh & Kumar, 2017).

La actividad enzimática total (U) se calculó con la fórmula que se muestra en la tabla IV. También se cuantificó por el método de Bradford el contenido total de proteína presente en este ensayo para calcular la actividad enzimática específica (U/mg). Una vez calculadas la actividad enzimática total y específica se calcula la actividad residual (%), utilizando la fórmula presente también en la tabla IV.

Tabla IV: Fórmulas Actividad Enzimática

	Formula	Autor
Actividad Enzimática Total (U)	$U = \frac{(ABS\ 280)(Factor\ de\ dilución)}{(0.001)[Tiempo\ de\ reacción(min)]}$	(Hernández-Sámano, <i>et al.</i> , 2015; Singh & Kumar, 2017)
Actividad Enzimática Especifica (U/mg)	$AE = \frac{Actividad\ Enzimática\ Total\ (U/mL)}{Contenido\ total\ de\ proteína\ (mg/mL)}$	(Sharma <i>et al.</i> , 2017)
Actividad Residual (%)	$AR = \frac{Actividad\ enzimática\ con\ tratamiento}{Actividad\ enzimática\ sin\ tratamiento} \times 100$	(Mothe & Sultanpuram, 2016)

#### 4.2.4. Curva de Crecimiento Microbiano y Curva de Actividad Enzimática

Se realizó una curva de crecimiento en 500 mL de caldo caseína, haciendo una dilución 1/20 del preinoculo, se incubo a 45°C con agitación constante de 150 rpm. La curva se realizó durante 72 h, tomando muestra cada hora por las primeras 12 horas y después cada 6 horas. Cada que se muestreaba se tomaba 2 mL del medio de cultivo, 1 mL se examinó en el lector de microplaca FLUOstar Omega a 600 nm; el otro mililitro se utilizó para cuantificar la actividad enzimática, utilizando el mismo método presentado anteriormente, se graficaron los datos

para obtener la curva de crecimiento con la curva de actividad enzimática, de esta manera saber en qué momento del crecimiento bacteriano se produce mayor actividad enzimática.

#### 4.2.5. Determinación del perfil de comportamiento de la proteasa a diferentes temperaturas y pH

Se realizó un perfil de comportamiento enzimático a diferentes temperaturas, utilizando un rango entre 20-90°C, en un pH 8, durante 20 minutos utilizando caseína como sustrato. Para el comportamiento enzimático en diferentes pH, se trabajó en un rango de pH entre 5.0-12.0 (para ajustar el pH se utilizaron diferentes buffers que se muestran en la tabla), incubando a 40°C (temperatura donde se presentó la máxima actividad enzimática) durante 20 minutos, utilizando caseína como sustrato. (Hadjidj *et al.*, 2018; Jellouli *et al.*, 2011). La reacción se detuvo con ácido tricloroacético al 5%, el sobrenadante se leyó en el lector de microplacas FLUOstar omega a 280 nm para detectar la presencia de tirosina. Se calculó la actividad enzimática total (U) y la actividad residual utilizando las fórmulas de la tabla IV. Para el caso de la actividad residual se comparó las actividades obtenidas en este ensayo contra la primera cuantificación realizada utilizando pH y temperatura óptima de crecimiento de la bacteria.

Tabla V: Buffers utilizados para ajustar los diferentes pH.

Buffer de Reacción con 1% de caseína	pH
Acetato de Sodio 100mM	5
Acetato de Sodio 100mM	6
Tris-HCl 100 mM	7

Tris-HCl 100 mM	8
Glicina-NaOH 100 mM	9
Glicina-NaOH 100 mM	10
Glicina-NaOH 100 mM	11
Glicina-NaOH 100 mM	12

#### **4.2.6. Determinación de la estabilidad de la proteasa a diferentes temperaturas y pH**

En estas pruebas se utilizaron la temperatura y el pH a los que se obtuvo la máxima actividad enzimática. En el caso de la prueba de estabilidad a diferentes temperaturas se incubó la mezcla de reacción a diferentes temperaturas entre 20-90 °C, en un pH 8 (pH que presentó la mayor actividad enzimática), durante 1 hora en cada temperatura. Para la prueba de estabilidad a diferentes pH, se evaluará en un rango de pH entre 3.0-8.0, la mezcla se incubó a 40°C (temperatura de máxima actividad enzimática) por 1 hora para cada pH. Se detuvo la reacción con ácido tricloroacético al 5%. Después de la incubación se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos (Salem, *et al*, 2016). El sobrenadante se examinó en el lector de microplaca FLUOstar omega a 280 nm, comparando con un estándar de tirosina, y se utilizó el mismo método para calcular la actividad enzimática total (U) previamente descrito en la sección 4.2.3. También se calculó la actividad residual (%) utilizando los valores obtenidos en este ensayo contra los valores obtenidos en las cuantificaciones de la actividad enzimática a diferentes temperaturas y pH.

#### 4.2.7. Determinación resistencia a surfactantes

Para la realización de esta prueba se utilizó la misma mezcla de reacción utilizada en los ensayos (se realizó el mismo método para determinar actividad enzimática total descrito en la sección 4.2.3) anteriores utilizando caseína como sustrato, en este caso se añadieron los detergentes (SDS y Tritón X-100) en diferentes concentraciones, estos ensayos se realizaron por separado para cada detergente y cada concentración, una vez lista la mezcla se incubo a 40°C y pH 8 (temperatura y pH de máxima actividad enzimática), por 1 hora; pasado el tiempo se detuvo la reacción con ácido tricloroacético al 5% después el contenido se centrífugo a 10 000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se examinó en el lector de microplacas FLUOstar omega a 280 nm para detectar la presencia de tirosina. Se calculó la actividad enzimática total (U) y la actividad residual del sobrenadante (actividad que queda después de perder la estabilidad) (Jellouli et al., 2011; Salem et al., 2016; Yilmaz et al., 2016).

Tabla VI: Detergentes y concentraciones utilizadas en cada ensayo para determinar la estabilidad.

Detergente	Concentración
SDS	0.1 % (p/v)
SDS	0.5 % (p/v)
SDS	1 % (p/v)
SDS	5% (p/v)
Tritón X-100	1% (v/v)
Tritón X-100	5% (v/v)

## **CAPITULO 5**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **5.1. Crecimiento del microorganismo**

Se realizaron cultivos sólidos para observar las características de las colonias producidas por *Bacillus licheniformis* LB04, así como también se realizaron tinciones Gram a los cultivos líquidos y sólidos para observar las características morfológicas de la bacteria. Para observar las características macroscópicas de las colonias se creció la bacteria en agar nutritivo y a las 24 horas de incubación se observaron colonias blanquecinas, húmedas con bordes irregulares y se presentó un crecimiento extendido por lo cual no se pueden observar colonias individuales y separadas (Imagen 2). En la imagen 3 se observan la morfología microscópica del *Bacillus licheniformis* LB04 la cual presenta bacilos cortos, Gram positivos, formados en cadenas (Whitman, 2009).



Imagen 1: Morfología macroscópica de *Bacillus licheniformis* LB04 en agar nutritivo.



Imagen 2: Morfología microscópica de *Bacillus licheniformis* LB04 en tinción de Gram observada en el objetivo 100x.

## 5.2. Determinación cualitativa de la actividad proteolítica del sobrenadante

La bacteria se creció en un medio rico en caseína esto para estimular la producción de proteasas y además que la caseína se utilizó como sustrato en todos los ensayos de cuantificación de la actividad enzimática. Para confirmar la producción de proteasas se utilizó el sobrenadante del medio de cultivo para observar el efecto de este en una placa de grenetina. Al retirar la placa de gelatina de la incubación a simple vista se observó una hidrólisis de la gelatina (Imagen 4a), se puede distinguir un cambio físico en la grenetina, cambiando su estado sólido a un estado líquido debido a la actividad proteolítica presente en el sobrenadante. Para evidenciar aún más este efecto se realizó una tinción con

Azul de Coomassie; debido a que el Azul de Coomassie se prepara en un medio ácido este permite que se forme una interacción de tipo Van der Waals, (debido a los grupos amino) formando un complejo entre las proteínas presentes en la gelatina y el colorante, esta unión proteínas-colorante es reversible (Schägger, Aquila, & Von Jagow, 1988). Entonces al realizar la tinción el colorante no se puede unir a la gelatina que sufrió hidrólisis, al realizar el lavado se observa las perforaciones sin coloración indicando donde ocurrió la actividad proteolítica como se puede observar en la imagen 4b.

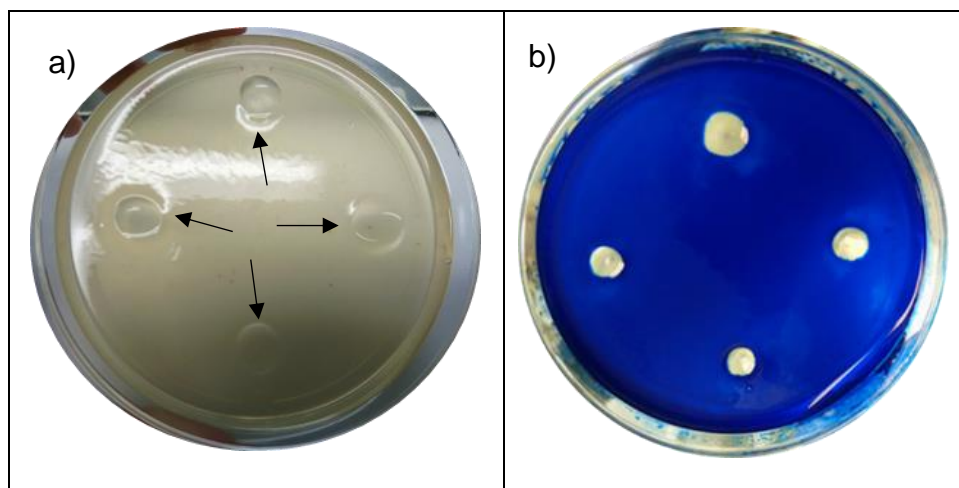


Imagen 3: a) Placa de gelatina después de 12 horas de incubación. las flechas indican la hidrólisis de la gelatina. b) Placa de gelatina teñida con Azul de Coomassie.

### 5.3. Curva Estándar de Tirosina

Mediante la realización de la curva estándar se tomó la ecuación de la recta resultado de las absorbancias medidas a 280 nm correspondientes de 0 a 100  $\mu\text{g/mL}$  de un estándar de tirosina (Imagen 4). Estos datos se utilizaron para calcular la concentración de tirosina presente en los ensayos de cuantificación de la actividad enzimática después de precipitar todas las proteínas con ácido tricloroacético quedando así solamente los residuos de tirosina como indicador de actividad proteolítica. Todos los aminoácidos aromáticos a diferentes grados absorben la luz ultravioleta; la tirosina y el triptófano absorben más que la

fenilalanina, la absorbancia entre 260-300 nm se debe principalmente a las cadenas laterales de los aminoácidos antes mencionados (Devlin, 1999). La tirosina es el único aminoácido aromático que cuenta con una cadena ionizable debido a esta característica la absorbancia de la tirosina se desplaza a una longitud de onda más elevada (280 nm) en comparación de los otros dos aminoácidos (Bent & Hayon, 1975). La tirosina, así como el triptófano son los culpables de darle la capacidad a la mayoría de las proteínas de absorber la luz ultravioleta (Murray et al., 2010).

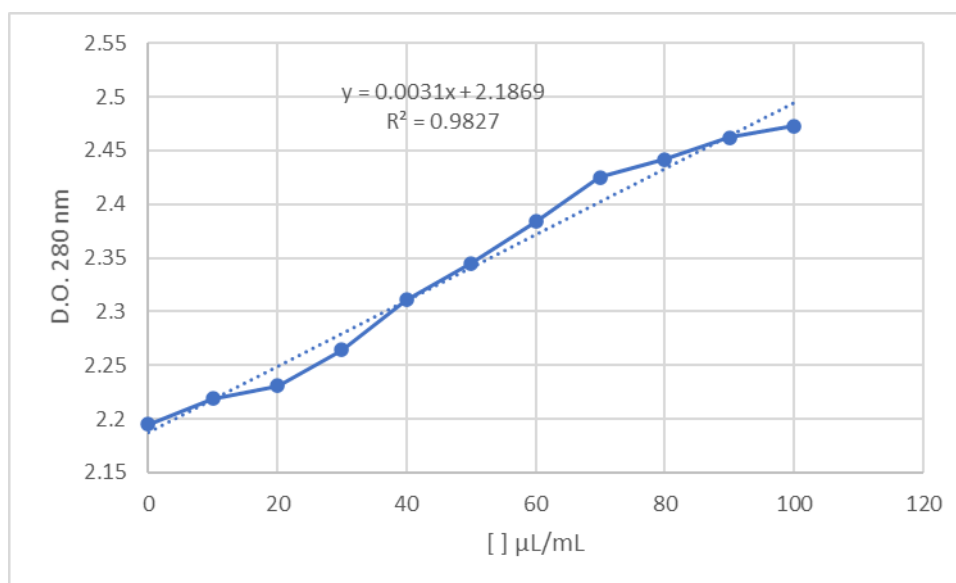


Imagen 4: Curva Estándar de Tirosina y Ecuación de la Recta

#### 5.4. Determinación Cuantitativa de la Actividad Enzimática

Para la cuantificación de la actividad enzimática se utilizó una temperatura de 45°C y un pH de 8.5 (condiciones que se utilizaron para crecer el microorganismo). Se obtuvo una actividad enzimática total de 117.1 U/mL.

Tabla VII: Resultados Cuantificación de la Actividad Enzimática en el Sobrenadante.

Actividad Enzimática Total	117.1 U/mL
Proteína Total	1.250 mg/mL
Actividad Enzimática Especifica	93.6 U/mg



Se debe tomar en cuenta que se trabajó con el sobrenadante del medio del cultivo pasando solo por la primera fase de purificación que en este caso es una centrifugación (Hadjidj *et al.*, 2018; Yilmaz, *et al.*, 2016; Yu, *et al.*, 2019), lo que indica que en el sobrenadante no se tiene la enzima pura de hecho además de las enzimas extracelulares también se pueden encontrar otros componentes del medio del cultivo o incluso de la bacteria; pero se ha observado en varias investigaciones que se utiliza el sobrenadante del medio de cultivo (o extracto crudo enzimático) para cuantificar la actividad enzimática total de manera que se pueda tener un valor inicial previo a los distintos protocolos de purificación que se utilizarán en la enzima; pero como en este proyecto no está en los objetivos la purificación de la enzima, se realizaron todas las cuantificaciones de actividad enzimática con el sobrenadante o extracto crudo enzimático.

Para realizar todas las cuantificaciones se utilizó caseína como sustrato, se seleccionó este sustrato principalmente por que se ha demostrado que *Bacillus licheniformis* tiene la capacidad de hidrolizar la caseína y gelatina ((Whitman, 2009); y tomando en base otras investigaciones donde utilizaron caseína como sustrato para la cuantificación de la actividad enzimática de diferentes proteasas producidas por bacterias del género *Bacillus* (Annamalai, *et al.*, 2014; Butré, *et al.*, 2015; Hadjidj *et al.*, 2018; Kembhavi, *et al.*, 1993; Shaikh, I.K. Dixit, 2017; Yilmaz *et al.*, 2016).

Tomando en cuenta lo anterior se obtuvo una actividad enzimática total de 117.1 U/mL a 45°C se puede considerar como una actividad enzimática óptima comparando con otras investigaciones que realizaron las reacciones enzimáticas para la cuantificación utilizando la misma temperatura a la que crecieron el microorganismo. Yilmaz y colaboradores en 2015 trabajaron con la proteasa producida por *Bacillus licheniformis* A10 obteniendo una actividad enzimática de 3474 U a 37°C. En 2016 se trabajó la proteasa del *Bacillus licheniformis* 7053 obteniendo una actividad de 185 U a 37°C (Lakshmi & Hemalatha, 2016), también Kumar y colaboradores en 2017 utilizaron la misma temperatura para la reacción

enzimática obteniendo una actividad enzimática de 28.9 U de la proteasa producida por la cepa PDB-24, por último en 2019 se caracterizó la proteasa del *Bacillus sp* ZJ1502 presentando una actividad de 254.2 U en 40°C (Yu *et al.*, 2019).

### 5.5. Curva de Crecimiento Microbiano y Curva de Actividad Enzimática

Se puede observar en la figura 6 que la actividad enzimática es proporcional al crecimiento de la bacteria ya que las curvas que se presentan siguen un comportamiento similar, ya que se presentó actividad enzimática desde la primera hora de incubación; se presentaron las mayores actividades enzimáticas en el rango de horas de 24-36 horas, este valor obtenido nos indicó cuanto tiempo incubar los cultivos para las pruebas restantes de caracterización y así trabajar con la mayor cantidad de proteasas. Se presento la máxima actividad enzimática de 127.7 U/mL a las 30 horas de incubación a 45°C.

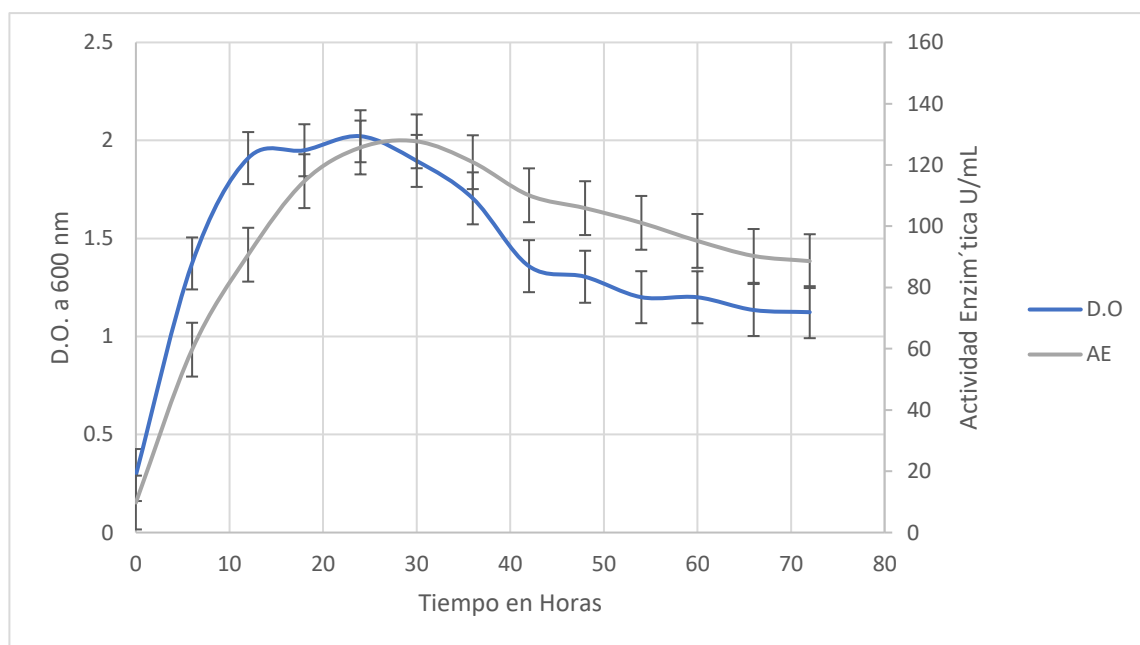


Imagen 5 Crecimiento de la bacteria *Bacillus licheniformis* LB04 expresado mediante la densidad óptica y la actividad enzimática total con respecto al tiempo.

Como se observa las curvas presentadas en la imagen 5 siguen un comportamiento similar, lo que indica que la proteasa es un metabolito primario. El metabolismo primario es el encargado de proporcionar energía a la célula y produce las macromoléculas necesarias para el crecimiento del microbiano; debido a que los compuestos producidos por este metabolismo son indispensables para el crecimiento, la producción de metabolitos primarios y el crecimiento microbiano se dan al mismo tiempo (Hernandez, 2003; Renneberg, 2008). Otras investigaciones también presentaron producción de enzima desde el inicio del crecimiento, se presentó diferencia en el momento de producción de enzimas más elevada, por ejemplo: *Bacillus sp* presentó su máxima producción enzimática en la fase exponencial tardía (20 horas), la cepa alcalófila de *Bacillus sp* presento la producción máxima al final de la fase exponencial y por último la cepa *Bacillus sp* APP-07 presento la secreción más alta de enzimas al inicio de la fase estacionaria (33 horas) (Mehrotra, *et al*, 1999; Patel, *et al*, 2005; Shaikh & Dixit, 2017). En general las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* producen más proteasa en la fase exponencial (Ward, 1986).

#### **5.6. Cuantificación de la Actividad Enzimática y Estabilidad a Diferentes Temperaturas**

Para la cuantificación de la actividad enzimática a diferentes temperaturas se utilizó un rango de temperaturas de 20-90°C, se obtuvo la máxima actividad enzimática a 40°C, se puede observar que la actividad enzimática disminuyo muy poco conforme aumenta la temperatura de los 40 a los 90°C (imagen 6), lo que indica que la enzima puede trabajar a temperaturas elevadas. En los últimos años se ha demostrado que las proteasas producidas por bacterias del género *Bacillus* presentan una temperatura óptima entre 40-70°C; *Bacillus sp* ZJ1505, *Bacillus licheniformis* W10, y *Bacillus brevis* MWB-01 producen proteasas que presentaron su actividad enzimática máxima a 40°C (Ji *et al.*, 2020; Olajuyigbe & Falade, 2014; Yu *et al.*, 2019); las proteasas producidas por *Bacillus alveayuensis* CAS5 y *Bacillus licheniformis* BL312 trabajan a 50 y 55°C respectivamente (Annamalai, *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2019); por último *Bacillus licheniformis* K7A,

*Bacillus licheniformis* A10 y *Bacillus halodurans* SE5 presentaron una temperatura óptima de 70°C (Hadjidj et al., 2018; Yakul et al., 2019; Yilmaz et al., 2016).

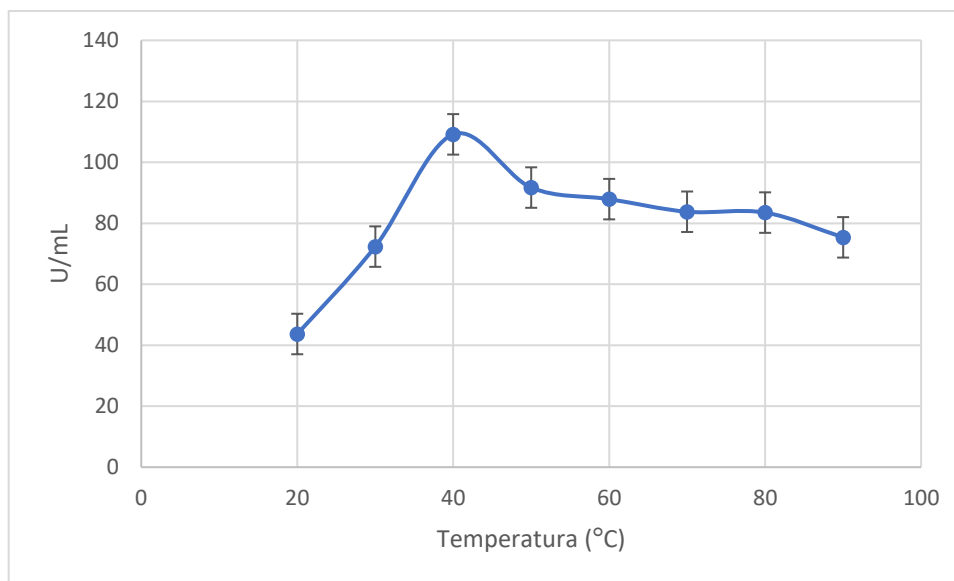


Imagen 5: Perfil de Actividad Enzimática a Diferentes Temperaturas

Para las cuantificaciones de estabilidad térmica se utilizó el mismo rango de temperatura utilizado anteriormente incubando por 1 hora. La actividad enzimática después de la prueba de estabilidad mantuvo una actividad residual del 65%, la actividad se perdió aproximadamente en un 40% en las temperaturas de 50-70°C; en las temperaturas de 80 y 90°C se obtuvo una actividad residual de 29%, a 30°C se perdió solo un 21% de la actividad residual presentando un 52%, por último la actividad residual en 20°C solo disminuyó en un 3% presentando un 41% de actividad después del tratamiento (Imagen 7). La actividad enzimática de la proteasa producida por el *Bacillus licheniformis* A10 se mantuvo en 70, 84, 95 y 98% en las temperaturas de 40, 50, 60, 70°C después de 1 hora de incubación (Yilmaz et al., 2016); en el caso de la proteasa producida por el *Bacillus licheniformis* BL312 posterior a 50 minutos de incubación en cada temperatura, mantuvo una actividad residual del 100% en las temperaturas de 35

y 40°C; en las siguientes temperaturas 45, 50 y 55°C se obtuvieron las siguientes actividades residuales 45, 25 y 10%, en los 60°C la actividad se perdió por completo (Zhang et al., 2019); por último la proteasa de *Bacillus brevis* se incubó por 1 hora en cada temperatura, la cual presento una actividad residual del 100% en 30°C, 90% en 40°C, 30% en 50°C y en las temperaturas de 60 y 70°C la enzima perdió su actividad (Olajuyigbe & Falade, 2014).

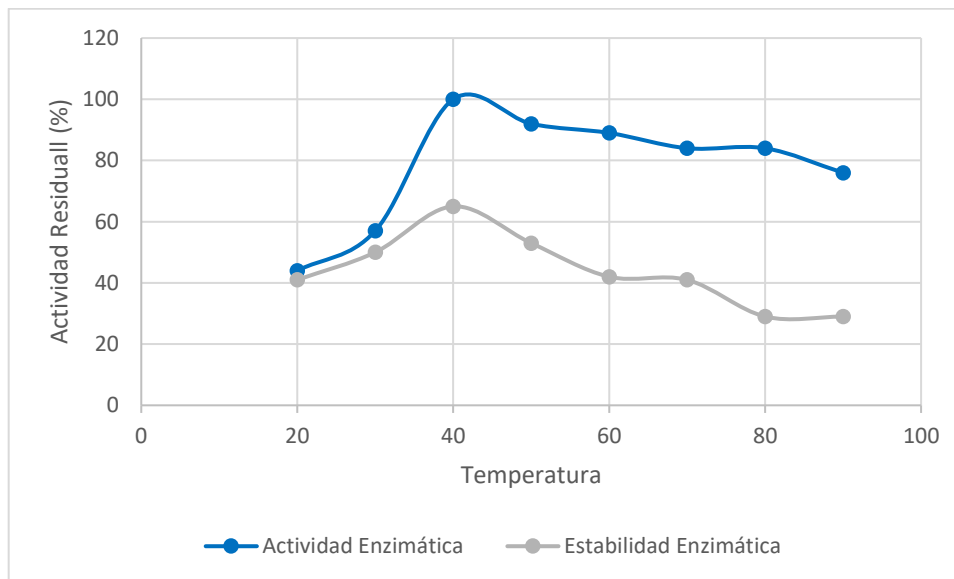


Imagen 6: Actividad Enzimática Total vs Estabilidad Enzimática a Diferentes Temperaturas

### 5.7. Cuantificación de la Actividad Enzimática y Estabilidad a Diferentes pH

Para observar el efecto del pH en la actividad enzimática del sobrenadante se trabajó en un rango de pH de 5-12; se seleccionó ese rango enfocado más al pH alcalino por dos razones: 1. Investigaciones recientes las proteasas producidas por bacterias pertenecientes al género *Bacillus* presentan una mayor actividad en pH alcalinos (8.0-12.0) (Whitman, 2009; Yilmaz *et al.*, 2016), 2. Se utilizó caseína como sustrato y debido a que esta proteína tiene un punto isoelectrico de 4.5 (Fox, *et al.*, 2004), al intentar preparar la mezcla de reacción en pH menores a 5 la caseína se precipito, por lo que solo se trabajó con pH arriba de 5.

Los resultados obtenidos muestran que la actividad enzimática presento valores mayores a partir del pH 8 a 12; presentan la actividad máxima a un pH de 8

(imagen 8); estos valores concuerdan con los pH a los que trabaja otras proteasas producidas por bacterias del género *Bacillus*: La proteasa producida por *Bacillus licheniformis* MP1 tiene un pH óptimo de 10 (Jellouli et al., 2011); *Bacillus sp* PDB-2 produce una proteasa con un pH óptimo de 8.5 (Parihar & Dubey, 2017), la proteasa de *Bacillus licheniformis* A10 trabaja con un pH óptimo de 9 (Yilmaz et al., 2016); por ultimo *Bacillus halodurans* SE5 su proteasa presenta un pH óptimo de 10.5 (Yakul et al., 2019). Generalmente las proteasas comerciales obtenidas de microorganismos presentan su actividad máxima en pH alcalinos por ejemplo las Subtilisinas trabajan en un rango de pH de 8.5-10 y las proteasas producidas por cepas alcalófilas de *Bacillus* tienen un pH óptimo de 10 (Yilmaz et al., 2016).

Según los resultados obtenidos se puede deducir que el extracto crudo enzimático contiene proteasas alcalinas, de hecho, la producción de proteasas alcalinas ha tenido mayor importancia esto debido al aumento de los procesos que se realizan en entornos alcalinos. Una gran cantidad de investigación está en proceso de desarrollo de proteasas, que funcionará en condiciones alcalinas como detergentes de ropa o removedores de manchas (Hadjidj et al., 2018).

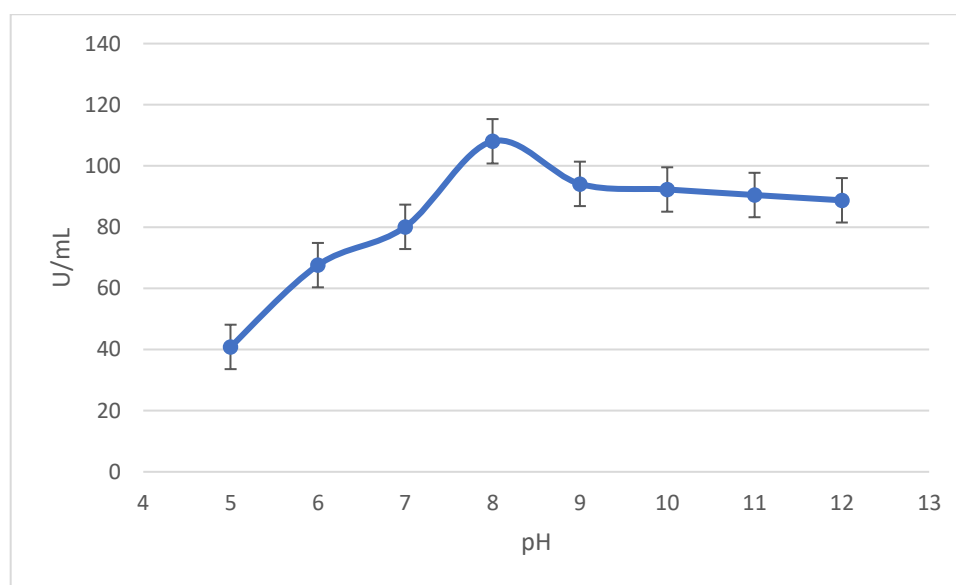


Imagen 7: Perfil de Actividad Enzimática a diferentes pH

Las pruebas de estabilidad presentaron una actividad residual máxima de 78% en un pH de 8 después de 1 hora de incubación a 40°C, en el rango de pH de 9, 10, 11 y 12 mantuvieron las siguientes actividades residuales 68, 57, 37 y 35% respectivamente (imagen 9). Se puede decir que el extracto crudo enzimático presenta proteasas con buena estabilidad en los pH 8, 9 y 10, ya que mantuvieron la actividad entre un 60-80%. Estos resultados concuerdan con los valores de estabilidad que tiene la proteasa producida por el *Bacillus licheniformis* A10 presentando una actividad de 75% a pH 8, un 60% a pH 9 y un 55% a pH 10 después de una hora de tratamiento a 37°C (Yilmaz et al., 2016); la proteasa de *Bacillus sp* ZJ1502 mantiene su actividad máxima en pH 9 y 10 (Yu et al., 2019). Hay otras proteasas que presentan una estabilidad en pH mayores a 10 como por ejemplo la proteasa de *Bacillus licheniformis* MP1 mantiene su actividad al 100% en un rango de pH de 10-12 de igual manera *Bacillus halodurans* SE5 produce una proteasa que mantiene su actividad en un 80% en un rango de pH de 9.5-12 (Jellouli et al., 2011; Yakul et al., 2019)

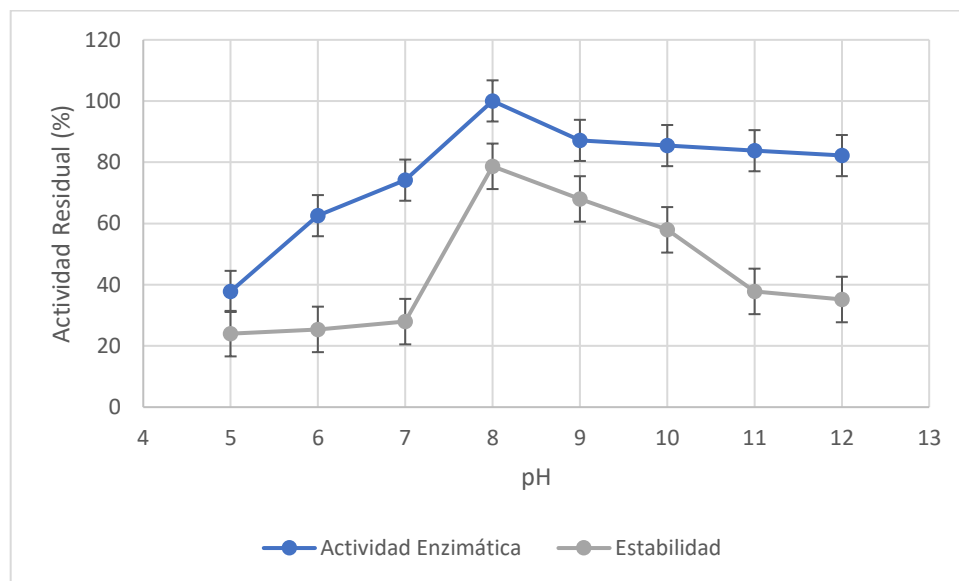


Imagen 8: Actividad Enzimática Total vs Estabilidad Enzimática en Diferentes pH

## 5.8. Determinación Resistencia a Detergentes

En la tabla VIII se muestran las actividades residuales obtenidas posterior al tratamiento con SDS y Tritón X-100 utilizando las concentraciones que se muestran en la tabla, se realizó un ensayo sin aditivo que se utilizó como control. En la tabla VIII se muestran las actividades residuales obtenidas después de tratamiento por 1 hora. El extracto crudo enzimático tiene alta resistencia a los dos detergentes surfactantes utilizados ya que ninguno logro inhibir la actividad enzimática por completo. La actividad residual obtenida al añadir SDS en concentraciones de 0.5%, 1%, 5% fueron las siguientes 91.7, 61.1 y 13.7%. Para el caso del Tritón X-100 solo se utilizaron do concentraciones 1 y 5% obteniendo una actividad del 98.5 y 84.2% respectivamente.

Se utilizaron dos surfactantes: uno del tipo aniónico (SDS) y otro del tipo no iónico (Triton X-100). Los surfactantes de tipo aniónico se caracterizan por presentar iones positivos y negativos en el agua; a diferencia de los surfactantes no iónicos no presentan iones en agua (Chang, 1999). Se ha demostrado que el SDS en concentraciones del 0.1% al 1% produce un aumento en la actividad enzimática de la proteasa producida por el *Bacillus safensis*, ya que el SDS es capaz de unirse a la enzima causando cambios conformacionales en la superficie sin cambiarla internamente, lo que facilita la unión del sustrato con el sitio activo (Cong *et al.*, 2009; Jalkute *et al.*, 2017). El triton X-100 se caracteriza como un surfactante “suave”, esto debido a que no desnaturaliza ni produce cambios conformacionales drásticos en las enzimas, este surfactante tiene la capacidad de romper los conglomerados de las proteínas (sin desnaturalizarlas) promoviendo la actividad enzimática (Garcia-Gurtubay, 2015).

Comparando los resultados obtenidos con otras investigaciones, se muestran resultados similares obtenidos al determinar la resistencia a surfactantes en proteasas producidas por diferentes bacterias del género *Bacillus*. Salem y colaboradores en 2016 caracterizaron la proteasa producida por *Bacillus licheniformis* RBS5 presento una resistencia al SDS manteniendo una actividad residual del 93% y un 14% en concentraciones del 1% y 5%, en el caso del Tritón



X-100 la proteasa mantuvo su actividad al 100%. La proteasa de *Bacillus licheniformis* MP1 mantiene su actividad en un 90.5, 62 y 50.5% en las concentraciones de SDS del 0.1, 0.5 y 1%; la actividad residual solo se disminuyó en un 2% al realizar el tratamiento con Tritón X-100 en una concentración del 1% (Jellouli et al., 2011). *Bacillus sp* ZJ1502 produce una proteasa resistente a SDS en concentraciones de 1mM y 10 Mm que mantiene su actividad en un 77% y 67%; también posee una resistencia al Tritón X-100 ya que la actividad enzimática no disminuyo (Yu, et al., 2019). *Bacillus alveayuensis* produce una proteasa alcalina y termoestable, presenta resistencia a SDS y Tritón X-100 manteniendo un 66% y 78% de actividad posterior al tratamiento con estos surfactantes (Annamalai, et al., 2014).

Tabla VIII: Actividad Enzimática Residual con el Efecto de Detergentes.

<b>Detergente</b>	<b>Concentración (%)</b>	<b>Actividad Residual</b>
<b>SDS</b>	0	100%
	0.5	91.7%
	1	61.1%
	5	13.7%
<b>Tritón X-100</b>	0	100 %
	1	98.5 %
	5	84.2 %

## **CAPITULO 6**

### **CONCLUSIONES**

El extracto crudo enzimático presentó la capacidad de hidrolizar gelatina y caseína mediante las pruebas cualitativas y cuantitativas, confirmando la presencia de proteasas. Se cuantificó una actividad enzimática total de 117.1 U/mL y una actividad enzimática específica de 93.6 U/mg a 45°C y pH 8.5 (condiciones a las que se creció la bacteria).

Se obtuvo una temperatura óptima a 40°C, se observó que en el rango de temperatura de 50-90°C se presenta una actividad enzimática entre el 80 y 70% en relación con la actividad enzimática máxima obtenida a 40°C. En las pruebas de estabilidad la actividad se perdió en un 40% aproximadamente después del tratamiento por 1 hora a diferentes temperaturas. Se presentó la actividad máxima en un pH 8, también presentó una actividad enzimática entre el 90-80% en un rango de pH de 9-12; así mismo se presentó buena estabilidad en estos pH ya que solo se perdió un 20% de su actividad original. Se presentó buena resistencia a SDS y Triton X-100 ya que no se perdió la actividad enzimática por completo, en el caso del SDS se presentaron actividades residuales del 91.7%, 61.1% y 13.7%, y con el Triton X-100 se presentaron actividades del 98.5% y 84.2%. Estos resultados nos indican que el extracto crudo enzimático contiene proteasas alcalinas y termoestables.

## BIBLIOGRAFIA

- Annamalai, N., Rajeswari, M. V., & Balasubramanian, T. (2014). Extraction, purification and application of thermostable and halostable alkaline protease from *Bacillus alveyensis* CAS 5 using marine wastes. *Food and Bioprocess Technology*, 92(4), 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.08.009>
- Armstrong, F. B., & Bennet, T. P. (1986). *Bioquímica* (1st ed.). Barcelona, España: Reverté. Retrieved from [https://books.google.com.mx/books?id=aDPwkniCkRgC&lpg=PA126&dq=hidrolasas tipos&pg=PR9#v=onepage&q=hidrolasas tipos&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=aDPwkniCkRgC&lpg=PA126&dq=hidrolasas+tipos&pg=PR9#v=onepage&q=hidrolasas+tipos&f=false)
- Bent, D. V., & Hayon, E. (1975). Excited State Chemistry of Aromatic Amino Acids and Related Peptides. I. Tyrosine. *Journal of the American Chemical Society*, 97(10), 2599–2606. <https://doi.org/10.1021/ja00843a002>
- Butré, C. I., Sforza, S., Wierenga, P. A., & Gruppen, H. (2015). Determination of the influence of the pH of hydrolysis on enzyme selectivity of *Bacillus licheniformis* protease towards whey protein isolate. *International Dairy Journal*, 44, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.12.007>
- Castillo-Rodriguez, F. (2005). *Biotecnología Ambiental* (1st ed.). Madrid: Tébar. Retrieved from [https://books.google.com.mx/books?id=19ffPAm3E3kC&lpg=PA397&dq=en zimas microbianas&pg=PA393#v=onepage&q=en zimas microbianas&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=19ffPAm3E3kC&lpg=PA397&dq=en+enzimas+microbianas&pg=PA393#v=onepage&q=en+enzimas+microbianas&f=false)
- Chang, R. (1999). *Química*. (J. C. Reza-Garcia, Ed.) (Sexta). Ciudad de Mexico: Mc Graw Hill.
- Cong, Y., Zhang, Q., Woolford, D., Schweikardt, T., Khant, H., Dougherty, M., ... Decker, H. (2009). Structural Mechanism of SDS-Induced Enzyme Activity of Scorpion Hemocyanin Revealed by Electron Cryomicroscopy. *Structure*, 17(5), 749–758. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.03.005>
- Contesini, F. J., Melo, R. R. De, & Sato, H. H. (2017). An overview of *Bacillus* proteases : from production to application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 0(0), 1–14. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1354354>
- Devlin, T. M. (1999). *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones medicas*. (C. Cuchillo, Ed.) (3rd ed.). Madrid: Reverté. Retrieved from <https://books.google.com.mx/books?id=LxFeEehEMCKC&lpg=PA79&dq=tir>

osina características 280 nm&pg=PR4#v=onepage&q=tirosina  
características 280 nm&f=false

- Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M., & Guinee, T. P. (2004). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1: General Aspects* (3rd ed.). Elsevier. Retrieved from <https://books.google.com.mx/books?id=vz-2Y7npqj0C&lpg=PA116&dq=isoelectric point casein&pg=PP1#v=onepage&q=isoelectric point casein&f=false>
- Garcia-Gurtubay Garcia, J. I. (2015). *Efectos del detergente no iónico tritón x-100 sobre las membranas mitocondriales*. Universidad Complutense de Madrid. Retrieved from <https://eprints.ucm.es/52231/1/5309852880.pdf>
- Hadjidj, R., Badis, A., Mechri, S., Eddouaouda, K., Khelouia, L., Annane, R., ... Jaouadi, B. (2018). Purification, biochemical, and molecular characterization of novel protease from *Bacillus licheniformis* strain K7A. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 1033–1048. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.167>
- Hernández-Sámano, A.C.; Guzmán-García, X.; García-Barrientos, R.; Ascencio-Valle, F. ., Sierra-Beltrán, A.; Vallejo-Córdoba, B.; González-Córdova, A.F; Torres-Llanez, M. J. ., & Guerrero-Legarreta, I. (2015). EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEASAS DE PEPINO DE MAR *Isostichopus fuscus* RECOLECTADO EN EL GOLFO DE CALIFORNIA, MÉXICO. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*.
- Hernandez, A. (2003). *Microbiología Industrial* (Primera). Costa Rica: EUNED.
- Ikram-UI-Haq, Ashraf, H., Qadeer, M. A., & Iqbal, J. (2005). Pearl millet, a source of alpha amylase production by *Bacillus licheniformis*. *Bioresource Technology*, 96(10), 1201–1204. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.09.012>
- Jalkute, C. B., Waghmare, S. R., Nadaf, N. H., Dhanavade, M. J., Jadhav, D. B., Pendhari, S. I., ... Sonawane, K. D. (2017). Purification and characterization of SDS stable protease from *Bacillus safensis* strain CK. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 10(February), 91–95. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.02.012>
- Jellouli, K., Ghorbel-Bellaaj, O., Ayed, H. Ben, Manni, L., Agrebi, R., & Nasri, M. (2011). Alkaline-protease from *Bacillus licheniformis* MP1: Purification, characterization and potential application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. *Process Biochemistry*, 46(6), 1248–1256. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.02.012>
- Ji, Z. L., Peng, S., Chen, L. L., Liu, Y., Yan, C., & Zhu, F. (2020). Identification and characterization of a serine protease from *Bacillus licheniformis* W10: A potential antifungal agent. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, 594–603. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.216>
- Kembhavi, A. A., Kulkarni, A., & Pant, A. (1993). Salt-Tolerant and

- Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus subtilis* NCIM No . 6 4, 38.
- Koneman, E. W., Winn, W. C., Procop, G. W., Allen, S. D., Schreckenberger, P. C., Janda, W. M., & Woods, G. L. (2008). *Koneman. Diagnostico Microbiologico: texto y atlas a color* (6th ed.). Buenos Aires: Medica Panamericana. Retrieved from <https://books.google.com.mx/books?id=jyVQueKro88C&lpg=PP1&dq=koneman microbiologia&pg=PR3#v=onepage&q=koneman microbiologia&f=false>
- Lakshmi, B., & Hemalatha, K. (2016). Production of Alkaline Protease from *Bacillus licheniformis* through Statistical Optimization of Growth Media by Response Surface Methodology. *Fermentation Technology*, 5(2). <https://doi.org/10.4172/2167-7972.1000130>
- Lei, F., Zhao, Q., Sun-Waterhouse, D., & Zhao, M. (2017). Characterization of a salt-tolerant aminopeptidase from marine *Bacillus licheniformis* SWJS33 that improves hydrolysis and debittering efficiency for soy protein isolate. *Food Chemistry*, 214, 347–353. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.028>
- Lo, C., & Bond, J. S. (2009). Proteases : Multifunctional Enzymes in Life and Disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(45), 30433–30437. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800035200>
- Mehrotra, S., Pandey, P. K., Gaur, R., & Darmwal, N. S. (1999). The production of alkaline protease by a *Bacillus* species isolate. *Bioresource Technology*, 67(2), 201–203. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00107-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00107-2)
- Mota-Pacheco, L. E. (2013). *Utilización de un medio enriquecido con melazas para la producción de biomasa de Bacillus licheniformis con potencial biofertilizante*. Universidad Tecnológica de la Mixteca. Retrieved from <https://books.google.com.mx/books?id=jyVQueKro88C&lpg=PP1&dq=koneman microbiologia&pg=PR3#v=onepage&q=koneman microbiologia&f=false>
- Mothe, T., & Sultanpuram, V. R. (2016). Production, purification and characterization of a thermotolerant alkaline serine protease from a novel species *Bacillus caseinilyticus*. 3 *Biotech*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0377-y>
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W., & Weil, P. A. (2010). *Harper Bioquímica Ilustrada*. (J. De Leon-Fraga, Ed.), Igarss 2014 (28th ed.). China: The McGraw-Hill Companies. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Negróni, M. (2009). *Microbiología Estomatológica: fundamentos y guía practica* (2nd ed.). Buenos Aires: Medica Panamericana. Retrieved from <https://books.google.com.mx/books?id=Gxmui-vjZBgC&lpg=PA383&dq=genero bacillus microbiologia&pg=PR4#v=onepage&q=genero bacillus>

microbiologia&f=false

- Olajuyigbe, F. M., & Falade, A. M. (2014). Purification and partial characterization of serine alkaline metalloprotease from bacillus brevis MWB-01. *Bioresources and Bioprocessing*, 1(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-014-0008-6>
- Parihar, R., & Dubey, S. K. (2017). Characterization of Protease Production Efficiency of Bacteria Present in the Poultry Farm Soil. *International Journal of Science and Research*, 6(1), 2015–2018.
- Patel, R., Dodia, M., & Singh, S. P. (2005). Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic Bacillus sp.: Production and optimization. *Process Biochemistry*, 40(11), 3569–3575. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.049>
- Ramírez D., N., Serrano R., J. A., & Sandoval T., H. (2006). Microorganismos Extremofilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37, 56–71.
- Renneberg, R. (2008). *Biotechnología para principiantes* (Primera). Barcelona, España: Reverté.
- Rey, M. W., Ramaiya, P., Nelson, B. A., Brody-Karpin, S. D., Zaretsky, E. J., Tang, M., ... Berka, R. M. (2004). Complete genome sequence of the industrial bacterium Bacillus licheniformis and comparisons with closely related Bacillus species. *Genome Biology*, 5(10), R77. <https://doi.org/gb-2004-5-10-r77> [pii]
- Salem, R. Ben, Abbassi, M. S., Cayol, J.-L., Bourouis, A., Mahrouki, S., Fardeau, M.-L., & Belhadj, O. (2016). Thermophilic Bacillus licheniformis RBS 5 isolated from hot tunisian spring co-producing alkaline and thermostable alpha-amylase and protease enzymes. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 05(06), 557–562. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2016.5.6.557-562>
- Sawant, R., & Nagendran, S. (2014). PROTEASE : AN ENZYME WITH MULTIPLE INDUSTRIAL. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(6), 568–579.
- Schägger, H., Aquila, H., & Von Jagow, G. (1988). Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 173(1), 201–205. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90179-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90179-0)
- Shaikh, I.K. Dixit, P. . (2017). PRODUCTION AND OPTIMIZATION OF THERMOSTABLE ALKALINE PROTEASE FROM BACILLUS SP-APP-07 ISOLATED FROM LAUNDROMAT SOIL. *International Journal of Science and Research*, (12), 346–348.
- Sharma, K. M., Kumar, R., Panwar, S., & Kumar, A. (2017). Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties.

- Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 115–126.  
<https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.02.001>
- Singh, S., & Kumar, B. (2017). Agroindustrial / Forestry Residues as Substrates for Production of Thermoactive Alkaline Protease from *Bacillus licheniformis* K-3 Having Multifaceted Hydrolytic Potential. *Waste and Biomass Valorization*, 8(2), 453–462. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9577-2>
- Tavano, O. L., Berenguer-Murcia, A., Secundo, F., & Fernandez-Lafuente, R. (2018). Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(2), 412–436. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12326>
- Ward, O. P. (1986). Proteolytic enzymes. *Comprehensive Biotechnology*, III(Academic Press), 789–815.
- Whitman, W. B. (2009). *Bergey's manual of systematic bacteriology - Vol 3: The Firmicutes*. (P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, ... W. B. Whitman, Eds.), Springer-Verlag New York Inc. (2nd ed.). USA: Springer. <https://doi.org/10.1007/b92997>
- Yakul, K., Takenaka, S., Nakamura, K., Techapun, C., Leksawasdi, N., Seesuriyachan, P., ... Chaiyaso, T. (2019). Characterization of thermostable alkaline protease from *Bacillus halodurans* SE5 and its application in degumming coupled with sericin hydrolysate production from yellow cocoon. *Process Biochemistry*, 78, 63–70.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.01.003>
- Yilmaz, B., Baltaci, M. O., Sisecioglu, M., & Adiguzel, A. (2016). Thermotolerant alkaline protease enzyme from *Bacillus licheniformis* A10: purification, characterization, effects of surfactants and organic solvents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(6), 1241–1247.  
<https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1118687>
- Yu, P., Huang, X., Ren, Q., & Wang, X. (2019). Purification and characterization of a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-tolerant alkaline protease from *Bacillus* s. ZJ1502, a newly isolated strain from fermented bean curd. *Food Chemistry*, 274(September 2018), 510–517. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.013>
- Zhang, Y., Xia, Y., Ding, Z., Phoeny, P. F., Wang, G., Xiong, Z., ... Ai, L. (2019). Purification and characteristics of a new milk-clotting enzyme from *Bacillus licheniformis* BL312. *Lwt*, 113(October 2018), 108276.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108276>